



PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 G01N 33/576	A1	(11) 国際公開番号 WO00/07023 (43) 国際公開日 2000年2月10日(10.02.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04129		(81) 指定国 AL, BR, CA, CN, JP, KR, LT, LV, MK, RO, RU, SI, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)
(22) 国際出願日 1999年7月30日(30.07.99)		添付公開書類 国際調査報告書
(30) 優先権データ 特願平10/216094 1998年7月30日(30.07.98)	JP	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 東燃株式会社(TONEN CORPORATION)[JP/JP] 〒150-8411 東京都渋谷区広尾一丁目1番39号 Tokyo, (JP)		
(72) 発明者 ; および		
(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 青柳克己(AOYAGI, Katsumi)[JP/JP] 大植千春(OHUE, Chiharu)[JP/JP] 飯田久美子(IIDA, Kumiko)[JP/JP] 八木慎太郎(YAGI, Shintaro)[JP/JP] 〒356-8505 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1号 東燃株式会社 総合研究所内 Saitama, (JP)		
(74) 代理人 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)		

(54)Title: **METHOD FOR ASSAYING HEPATITIS C VIRUS**

(54)発明の名称 C型肝炎ウイルスの測定方法

(57) Abstract

A method for assaying hepatitis C virus (CHV) characterized by comprising binding CHV core antigen and CHV core antibody to probes thereof in the presence of a cationic surfactant and/or a nonionic surfactant.

(57)要約

C型肝炎ウイルス（CHV）の測定方法において、陽イオン性界面活性剤もしくは非イオン性界面活性剤又はその両者の存在下で、CHVコア抗原及びCHVコア抗体をそれらのプローブとの結合により測定することを特徴とする方法。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シエラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	SZ スワジ兰ド
BF ブルガリア・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TG トゴー
BJ ベナン	GN ギニア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサオ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HR クロアチア	共和国	TR トルコ
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	ML マリ	TT トリニダッド・トバゴ
CG コンゴー	ID インドネシア	MN モンゴル	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IL イスラエル	MW マラウイ	US 米国
CM カメルーン	IN インド	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジエール	VN ヴィエトナム
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	YU ユーゴスラビア
CU キューバ	JP 日本	NO ノルウェー	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュー・ジーランド	ZW ジンバブエ
CZ チェコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

明細書

C型肝炎ウイルスの測定方法

発明の分野

本発明は、C型肝炎ウイルス（HCV）の検出方法に関し、さらに詳しくは、HCVコア抗原を測定するか、又はHCVコア抗原とHCVコア抗体を同時に測定するための方法に関する。この方法は多数の血液試料等のスクリーニングのために特に有効である。

背景技術

HCV（C型肝炎ウイルス）の感染によって引き起こされる肝炎は、高い頻度で慢性化し、感染期間が長期化するにつれ、肝硬変、肝ガンとしばしば移行する。しかしながらHCVの感染は、主に血液および血液由来成分によってもたらされることから、感染源を特定し、排除することにより感染経路を遮断することが可能である。現在感染源を特定する方法としては、主にHCVポリペプチドに対する抗体を検出する方法が採られているが、より高い精度で感染源を特定できる方法が求められていた。

求められる背景としては、HCV感染後、抗原は存在するが抗体が産生されない、いわゆるウィンドピリオド（Window period）と呼ばれる時期が存在することにある。この期間にある血清は、抗体検査により感染の有無を判別することができない。抗体検査ではウィンドピリオド期にある検体を排除できないため、抗体検査によりスクリーニングを行っている輸血や血液成分、血液製剤などの血液由来物質を利用する場合は、ウィンドピリオドにある検体による二次感染の危険性が存在している。そのためHCVポリペプチドに対

する抗体ではなく、HCVそのもの、つまりHCVパーティクルを検出する必要があった。

HCVそのものを検出、測定することは、HCVパーティクルを構成している抗原または遺伝子（RNA）を検出することにより可能となる。ここでHCVパーティクルを構成している抗原は、コア抗原、エンベロープ抗原（E1, E2）であると考えられている。

このうちエンベロープ抗原は、超可変領域（Hyper Variable Region）に代表されるように、抗原性の高い領域で変異が多い。また遺伝子型間での違いも報告されている。これらの変異、違いを全て検出するためには、複数の領域に特異的に結合するプローブを用いる必要がある。

なおここでプローブとは、抗原に特異的に結合する分子、たとえばレセプター、抗体、組換え抗体、機能性分子、または機能性構造物の様に、抗原分子を認識し結合するものをいう。

一方コア抗原はアミノ酸配列レベルで配列が保存されており、領域を選択することにより、複数種類の遺伝子型が報告されているHCVのいずれの遺伝子型の抗原も検出できるプローブを得ることが出来るため、遺伝子型に依存しない検出方法を構築することが可能となる。

しかしながら抗原を検出する系を構築するためには留意しなければならない点がある。すなわち、被験者である検体中には抗体が存在する可能性が高く、これらの抗体が、抗原を検出するためのプローブと結合部位を競合し、プローブの結合を阻害することにより抗原の検出感度を下げる。そのため抗原を効率良く検出するためには、抗体の結合しない領域もしくは抗体の結合によりプローブの結合が干渉されない領域を認識するプローブを用いる方法が考えられる。しかしながら、HCVコア抗原のように複数の抗体結合部位が報

告されている分子において、前述の条件をみたすプローブを作成することは困難である。

そのため抗原分子を検出するためには、プローブの結合を阻害する抗体を除く必要がある。除く方法としては、物理的な原理に従つて除く方法、例えば分子量の違いを利用して、HCVパーティクルと抗体とを分離分別する方法がある。この例として、ゲル濾過、超遠心分離法、密度勾配遠心分離法、限外濾過膜等の膜を利用した分子量分画法がある。しかししばしば抗体は、他の生体高分子と複合体を形成し高分子量に変化するため、物理的な原則にしたがった方法では、HCVパーティクルとの分別が困難になる。またこれらの方法は、処理行程に特殊な機器を用いることなどから、血液のスクリーニングなどのマススクリーニングに適用することは困難である。

一方生化学的な原理に基づいた方法、例えばPEG（ポリエチレングリコール）などの水環境を変化させることにより、HCVパーティクルと他の血清成分との化学的性質の違い、例えば水に対する溶解性の違いを利用してHCVパーティクルを優先的に沈澱させることにより分別する方法もあるが、抗体または抗体複合体はしばしばパーティクルと同様の分画に沈澱し、分画すること自体が困難となる。またHCVパーティクルは、しばしばHCVパーティクルを構成している抗原とそれを認識する抗体との免疫複合体を形成しており、免疫複合体から抗体または抗原のみを分離することは困難である。

そのためプローブの機能を阻害する物質（抗体など）を機能的に破壊することにより除く方法がとられる。抗体の機能を失わせる方法としては、タンパク質を変性させる条件に露呈させることにより抗体タンパク質を変性させる方法が考えられるが、ここで重要なこ

とは抗体の機能は失わせるが、目的とする抗原の機能、つまりプローブと結合する機能、すなわちプローブが抗体の場合にはエピトープを消失させない、またはエピトープを再提示させる条件である。

HCVの感染の有無を判別する方法に求められる機能は、その目的により異なる。

抗体検査は検体中にHCVに対する抗体が存在するか否かを判別する方法であるが、検体中にHCVに対する抗体が存在した場合、その検体の供与者が現在HCVに感染しており検体中にHCVが存在している場合もあれば、すでに治療または自然治癒によりHCVが体内から排除されている場合もあり、抗体の有無によりこれらを区別することは困難である。

抗原検査は、HCVが検体中に存在しているか否か、または存在している場合にはその量の多寡を知らせることが重要な機能であり、その際に抗体が存在しているか否かは問題とならない。

治療の際には、肝炎がHCVを主たる原因とするか否かを決定するためには、HCVの抗体検査が重要な情報を与えるが、最終的にはHCVの抗原の有無が確定診断には求められる。また治療効果判定には、HCVが体内から排除されているか否かを判定することが重要であり、判定には抗原の量の多寡を知ることが重要である。すなわち抗体の有無に関係なく抗原の有無、その量を知ることが治療に重要である。すなわち治療においては、抗原の有無とその量を与える検査方法がもっとも重要な方法である。

一方血液および血液由来製剤においては、二次感染の抑止がもっとも重要であり、そのためにはHCVの感染源としての危険性の有無を判別することが検査方法に求められる。現在この分野では主たる検査方法として抗体検査が用いられている。

しかしながら前述のように、HCV感染後のウィンドピリオドに

ある血清は、抗体検査により感染の有無を判別することができない。故に、抗体検査によりスクリーニングを行っている輸血や血液成分、血液製剤などの血液由来物質を利用する場合は、ウィンドピリオドにある検体による二次感染の危険性が存在する。

危険性をより軽減させるためには抗原検査の併用が求められるが、献血などの血液検査のようなマススクリーニングでは未だ抗原検査は行われていない。

理論的には 100% の精度（感度、特異度）で抗原の有無を判定できる検査方法が存在すれば、それを唯一の検査方法とすれば良いが、いかなる検出方法でも検出感度が存在し、検出感度以下のものは測定できない。故に 100% の精度で判別できる検査方法は存在しない。また特殊な例においては抗原検査のみでは感染源を逃す可能性が存在し、そのためこの分野においては抗体と抗原の両者を測定することが、二次感染の危険性を軽減させるために必要である。マススクリーニングに適用でき、高い感度、特異性を示す抗原検出方法が用いられるようになった場合、抗原と抗体の両方を測定することが求められるようになり、同一検体数での検査数が現在よりも増加し、コストアップ要因となる。

このようなことから、抗原と抗体を同一方法で測定することが可能となれば、当該分野においては検査数の軽減をはかることが出来、多大な効果を与えることが分かる。

すでに記したように抗体を検出する方法、抗原を検出する方法は開発されているが、前述のごとく抗体を検出する条件では、抗原を検出しようとすると、抗原を検出するプローブの結合を阻害する抗体が存在することにより抗原を効率良く検出できない。一方抗原を検出する条件でも、前述のごとく、抗原の検出を競合阻害する抗体を除く方法がとられることから、抗体を検出できない。それゆえす

でに報告されている方法では抗原と抗体を同一方法で検出することはできない。

発明の開示

血液および血液由来の物質を利用する際の、二次感染軽減の目的においては、感染者、感染既往者を区別する必要はなく、抗体または抗原が存在するか否かを判別できればよい。すなわち本発明は、ウィンドピリオド期のように抗体の存在しない時期の検体では抗原を検出し、抗体の存在する時期の検体では抗原を、又は抗原と抗体を検出する方法を提供することにより、血液および血液由来物質の検査に求められる新しい検査方法を提供する。

上記の課題を解決するため、本発明は、C型肝炎ウイルス（HCV）の測定方法において、アルキル基と第2～第4級アミンとを有する界面活性剤もしくは非イオン界面活性剤、又はこの両者の存在下で、HCVコア抗原をそのプローブとの結合により測定することを特徴とする方法を提供する。

本発明はさらに、上記の方法によるHCVコア抗原の測定と共に、HCVコア抗体を、そのプローブとの結合により測定することを特徴とする方法を提供する。

図面の簡単な説明

図1は、モノクローナル抗体C11-15の抗体価を、他のモノクローナル抗体C11-3, C11-7, C11-10及びC11-14の抗体価と比較して示すグラフである。

図2は、本発明の種々のモノクローナル抗体を単独で、又は混合して一次抗体として固相に固定して使用し、HCV-RNA陽性検体を測定した場合のELISAの結果を示すグラフである。

発明の実施の形態

本発明の提供するHCV感染検出方法は、ウィンドピリオド期のように抗体の存在しない時期の検体では抗原を検出し、抗体の存在する時期は抗原を、又は抗原と抗体の両者を検出する方法である。すなわち抗体の存在しない時期、ウィンドピリオド期においては抗体が存在しないため、抗原を検出する際に抗体を除く必要はないことになる。故に抗原を検出するために必要な前処理を行う必要はなくなる。

しかしながら、HCVパーティクルに含まれる抗原を検出するためには、検出のために用いるプローブの認識部位を露呈させることが重要である。HCVウイルスパーティクルは、ゲノムである核酸とコア抗原が複合体を形成して粒子を形成し、その粒子を脂質膜とエンベロープタンパク質からなる外膜が覆った構造をしていると考えられている。さらに血液中では低密度リポプロテイン（LDL）やHCVに対する抗体などとの複合体を形成して存在していると考えられている。そのため、血液中に存在するウイルスパーティクルのままでは、プローブはコア抗原を認識し結合することが出来ない。故にコア抗原を検出するためには、コア抗原を取り囲むこれらの構造物を除去するなどの処理をして、コア抗原がプローブに認識されるようにする必要がある。

すなわち本発明においては、検体中に含まれるHCVパーティクル中のコア抗原を、コア抗原を認識するためのプローブが認識できるように露呈させる反応条件、反応させる系からなる反応方法、および反応させる系を含む試薬をも提供する。

一方抗体が十分に存在している時期においては、前述のごとく、検体中にはプローブの結合部位と競合するコア抗原に対する抗体が存在している場合があるが、その場合にはコア抗原の検出感度が低

下する可能性がある。またコア抗原をプローブと結合できるように露呈させた場合には、プローブと競合するコア抗原に対する抗体が含まれた場合、抗体は露呈されたコア抗原に吸収され、抗体を免疫複合体を検出する方法によって検出するための抗原に結合するコア抗原に対する抗体の量が減少し、検出感度が低下する可能性がある。

そのため抗体の検出に用いる抗原は、コア抗原のエピトープのみからなるものでもよいが、好ましくはコア抗原以外のHCVエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドである。またHCVエピトープを模倣する、HCVエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド以外のペプチドまたはポリペプチド、または化合物であってもよい。

ただしコア抗原を検出するためのプローブと、HCVエピトープまたはHCVエピトープを代替する化合物とは、互いに認識しあうことにより結合するものでないことが好ましい。

HCVコア抗原のためのプローブとしての抗体又はHCVコア抗原を検出するための標識される抗体は、マウス、ウサギ、ニワトリ、ヤギ、ヒツジ、ウシなどの実験動物を免疫して得られるポリクローナル抗体；免疫した個体から、脾臓細胞を分離し、ミエローマ細胞と融合させることによって得られるハイブリドーマの產生するモノクローナル抗体；または脾臓細胞、血中白血球をEBウイルスによって不死化させた細胞の產生するモノクローナル抗体；HCVに感染しているヒトもしくはチンパンジーなどが產生しているモノクローナル抗体；

マウス、ヒトなどのイムノグロブリンのcDNAもしくは染色体DNAから得られる可変領域遺伝子断片、またはイムノグロブリンのcDNAもしくは染色体DNAの一部と人工的に作製した配列と

を組み合わせることによって構成される可変領域遺伝子断片、人工的な遺伝子配列を用いて構成される可変領域遺伝子断片またはこれらを材料に遺伝子組換え手法によって作製される可変領域遺伝子断片を、イムノグロブリン定常領域遺伝子断片を組み合わせることによって構成される組換え抗体遺伝子によって形質転換された細胞が產生する組換え抗体；上記の可変領域遺伝子断片と例えればバクテリオファージの構造蛋白質と融合させて作られるファージ抗体；上記の可変聴域遺伝子断片を他の適用な遺伝子断片例えれば $m\ y\ c$ 遺伝子の一部などと組み合わせることにより構成される組換え抗体遺伝子によって形質転換された細胞が產生する組換え抗体などである。

トリプシン分子に可変領域を人工的に導入することによって產生されるプローブ、レセプターなどの蛋白質に特異的に結合する分子を人工的に改変することによって得られるプローブ、その他コンビナトリアルケミストリー技術によって作製されたプローブなど、コア抗原に高い特異性、親和性を示す分子であればそれを用いることが出来る。

上記のモノクローナル抗体は、当業者により容易に作製することができる。ハイブリドーマによるモノクローナル抗体の作製は良く知られている。例えは、B A L B / c マウスなどの腹腔内あるいは皮内に、上記融合ポリペプチドもしくはポリペプチド（以下、本抗原）を単独もしくは B S A, K L H などと結合させた抗原として、単純あるいはフロイント完全アジュバント等のアジュバントと混合して定期的に免疫する。血中の抗体価が上昇した時点で、追加免疫として本抗原を尾静脈内に投与し、無菌的に脾臓を摘出した後、適当なマウス骨髄腫細胞株と細胞融合し、ハイブリドーマを得る。本方法は、KohlerとMilsteinの方法（Nature 256: 495-497, 1975）に従って行なうことができる。

上記方法により得られたハイブリドーマ細胞株を適当な培養液中で培養し、その後、本抗原に対して特異的な反応を示す抗体を產生するハイブリドーマ細胞株を選択してクローニングする。抗体產生ハイブリドーマのクローニングには限界希釈法のほか軟寒天法 (Eur. J. Immunol. 6: 511-519, 1976) などを利用することができる。そして、產生されたモノクローナル抗体をプロテインAなどを用いたカラムクロマトグラフィーなどの方法により精製する。

上記のモノクローナル抗体以外にもプローブとして用いる分子は作製することが出来る。例えば組換え抗体についてはHoogenboonの総説などに詳しく記載されている (Trends in Biotechnology, 15: 62-70, 1997)。

本発明において、検体中のHCVコア抗体のためのプローブとしての抗原又は前記HCVコア抗体を製造するための抗原は、具体的には、例えば配列番号：1又は2に示すアミノ酸配列を有するポリペプチド、あるいは配列番号：3～6に記載の複数のアミノ酸配列を含有する融合ポリペプチドであり、これらは、これらをコードするDNAの組換え発現により得ることができる。

ここで検出原理は、酵素標識抗体方法、蛍光標識方法、ラジオアイソトープ標識方法など通常の免疫測定法に用いられる方法を用いてもよく、酵素標識抗体法における酵素検出原理は、比色法、蛍光法、化学発光法などがある。また抗体の検出には、二抗原サンドイッチ法のような、抗体検出に一般的に用いられる方法を用いてもよく、さらに抗原の検出にも同様に一ステップサンドイッチ系などの方法を用いることも出来る。

本発明の様態の一つは、以下のような反応系である。 (1) HCVコア抗原に対するプローブ、たとえばHCVコア抗原に対する抗体と、 (2) HCVエピトープを含む化合物、たとえばHCVポリ

ペプチドのエピトープを含むペプチド、ペプチド化合物またはポリペプチド、およびこれらの混合物を、免疫測定法に用いられる担体、たとえばミクロタイタープレートに固相化させる。固相化させた担体を、HCVパーティクル、またはパーティクル複合体からHCVコア抗原をプローブが認識できるように露呈させ、かつHCVエピトープに対する抗体の機能を阻害させないような成分を含む反応緩衝液中で、被検体と反応させ、検体中に含まれるコア抗原およびHCVエピトープに対する抗体を担体に特異的に結合させる。

次に、結合されなかった検体中の成分を、たとえば担体を適当な緩衝液で洗浄することによって除いた後、担体に結合したコア抗原を認識するプローブたとえばコア抗原に対する酵素などで標識された抗体と、担体に結合したHCVエピトープに対する抗体を認識するプローブ、たとえば酵素などで標識された抗-ヒト抗体マウスモノクローナル抗体を含む反応液と反応させることにより、担体に結合したコア抗原とHCVエピトープに対する抗体に特異的に結合させる。反応終了後、未反応の成分を取り除くため、たとえば担体を適当な緩衝液で洗浄した後、標識を適当な方法で検出することにより、検体中に含まれるコア抗原とHCVエピトープに対する抗体を検出することが可能となる。

またイムノクロマト法などの一般的に免疫測定法に用いることの出来るB／F分離法にも適用可能であることは、当該分野の研究者にとっては自明である。

抗原検出に適した反応条件

本発明が提供する系における抗原検出に適した反応系とは、HCV抗原エピトープに対する抗体の機能を失わせない程度のマイルドな条件でありながら、検体中に存在する複雑な構造体であるHCVパーティクルから、HCV抗原を認識するプローブである抗体の認

識する領域を十分に露呈させる条件からなる系である。

すでに超遠心法にて分離したウイルスパーティクル (Takahashi et al., 1996, J. Gen. virol, 73:667-672)、ポリエチレングリコールによって凝集沈殿させた HCV パーティクルを Tween 80 や Triton X 100 の様な非イオン性の界面活性剤によって処理することにより (Kashiwakuma et al., 1996, J. Immunological methods 190:79-89)、コア抗原が検出可能であることが示されているが、前者においてはその検出感度が不十分であり、十分に抗原が露呈されているかは疑問である。また後者においては他の処理剤を加えることにより抗体を失活させており、界面活性剤の効果そのものについては触れられていない。

本発明においては、始めに界面活性剤を基本に条件を検討し、反応液を界面活性剤を中心とした組成にすることにより、すでに報告されている HCV 抗原検出系のように、遠心操作や加熱などの操作からなる前処理法を適用することなく、単に反応液中で検体を希釈することのみにより、HCV パーティクル中の抗原を効率良く検出することが可能となった。

効果的にウイルス粒子中からコア抗原を抽出し、かつ血清中の様々な物質との相互反応を抑制し、効率よくプローブと抗原とが反応できる条件を与えることが必要である。この際の効果的な界面活性剤としては、アルキル基と第 2 ～ 第 4 級アミンを同一分子内に有する界面活性剤、又は非イオン性界面活性剤が挙げられる。

前記アルキル基と第 2 ～ 第 4 級アミンを有する界面活性剤において、アルキル基に好ましくは直鎖アルキル基であり、その炭素原子数は好ましくは 10 個以上、さらに好ましくは 12 ～ 16 個である。アミンとしては第 3 アミン又は第 4 アミン (アンモニウム) が好ましい。具体的な界面活性剤としては、ドデシル - N - サルコシン

酸、ドデシルトリメチルアンモニウム塩、セチルトリメチルアンモニウム塩、3-(ドデシルジメチルアンモニオ)-1-プロパンスルホン酸、3-(テトラデシルジメチルアンモニオ)-1-プロパンスルホン酸、ドデシルピリミジウム塩、セチルピリミジウム塩、デカノイル-N-メチルグルカミド(MEGA-10)、ドデシル-N-ベタイン等が挙げられる。ドデシル-N-サルコシン酸及びドデシルトリメチルアンモニウム塩が好ましい。

前記の非イオン性界面活性剤としては12~14の間の親水疎水比を有するものが好ましく、ポリオキシエチレンイソオクチルフェニルエーテル類、例えばTriton X100、Triton X114など、あるいはポリオキシエチレンノニファニルエーテル類、例えばNonidet p40, Triton N101、Nikkol N1NP等が好ましい。

本発明においては、上記2つのタイプの界面活性剤を単独で用いてもよいが、併用するのが一層好ましく、併用により相乗効果が得られる。

さらにHCVエピトープに対する抗体を検出するように、HCVエピトープを含む抗原と、HCV抗原を検出するための抗体を固相化した担体と、本発明が提供する反応液で希釈した検体と反応させることにより、HCV抗体が存在せずHCV抗原を含む検体においては、抗原を効率良く検出し、HCV抗原が存在せず抗体のみが存在する抗体においては効率良く抗体を検出し、さらに抗原と抗体が存在する検体では、抗原と抗体を同時に検出することにより高いシグナルを与えていていることを見いだし、本発明を完成させるに至った。

ウイルスの抗原とウイルス抗原に対する抗体を同時検出する方法は、すでにHIVで報告されている(Weber et al., J.Clinic.Mic

robiol., 36:2235-2239, 1998)。HIVの場合には、ウイルス抗原検査としてgag蛋白質であるp24を検出することが有効である。一方ウイルス抗原に対する抗体検査では、envelope蛋白質とgag蛋白質であるp19に対する抗体を検出することが有効である。そのためウイルスの抗原とウイルス抗原に対する抗体を同時検出する方法は、抗原検査としてgag蛋白質であるp24を検出し、抗体検査としてenvelope蛋白質とgag蛋白質の一部であるp19に対する抗体を検出する方法を組み合わせることにより達成される。

このようにウイルス抗原検出に用いる抗原のエピトープと、ウイルス抗体検出に用いる被検体中の抗体が認識するエピトープが異なる場合、ウイルス抗原とウイルス抗原に対する抗体を同時検出する方法の構築は比較的容易である。なぜならば、たとえばHIV検査の場合、抗原検出に用いるプローブ、たとえばHIVエピトープに対するモノクローナル抗体、の認識する抗原p24と、抗体検査で被験者の試料中に含まれる抗体の認識する抗原、envelope蛋白質とgag蛋白質の一部であるp19とは異なる蛋白質であり、抗原検査に用いるプローブがenvelope蛋白質とgag蛋白質の一部であるp19を認識することはない。ゆえに、プローブが抗体検出に用いるHIVエピトープに結合することによって起こる競合反応による感度低下、非特異反応など、抗原検出系、抗体検出系が互いに他の系を干渉することが起こり難いためである。

しかしながら、HCVエピトープに対する抗体検出においては、コア抗原エピトープに対する抗体を検出することが臨床的に非常に有用である (Chiba et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4641-4645, 1991, Bresters et al., Vox Sang., 62:213-217, 1992)。ゆえに、抗体検出においてコア抗原エピトープに対する抗体を検出する

こよは必須の要件である。一方抗原検出においては、ウイルスパーティクルを構成する抗原のうち、コア抗原は、他の抗原、E 1, E 2よりも変異率が低いため、コア抗原を検出することは、HCV抗原検出においてもっとも有効な方法である。すなわち、効果的なHCVの抗原抗体同時測定を構築するためには、抗原検出系と抗体検出系で同じ抗原、コア抗原を用いる必要がある。

そのため、何の工夫も無くコア抗原を用いた場合、抗原検出に用いるコア抗原に対するモノクローナル抗体が、抗体検出に用いるコア抗原に結合し、吸収され被検体中の抗原の検出感度が低下する、抗体検出に用いる抗原に結合し、抗原検査の非特異反応を誘発する、抗体検査のためのHCVエピトープがマスクされ感度が低下するなどの問題が起こる。

本発明者らはこの問題を解決するために、抗原検出に用いるモノクローナル抗体のエピトープと、被検体中に存在するコア抗原に対する抗体のエピトープを分割させることにより、抗原と、抗体を同時に効率良く検出できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

以下実施例を詳細に説明することにより、抗原と抗体の同時測定のための好適なエピトープの組み合わせ例を示す。

コア抗原に対する被検体中の抗体のエピトープについては、様々なエピトープ解析の結果から、最も重要な領域がコア抗原のN末、特にHCVポリペプチドの第1位から40位に存在することが示されている (Okamoto et al, Hepatology 15:180-186, 1992, Sallberg et al, J.Clinical.Microbiol., 30:1989-1994, 1992, Sallberg et al., J Med. Vilol, 43:62-68, 1994)。また遺伝子型特異的に反応するエピトープがHCVポリペプチドの第66位から第80位にある (Machida Hepatology 16:886-891 '92、特願平9-20

9522）。そのため、HCVエピトープに対する抗体を検出するための抗原として、HCVポリペプチドの第1位から第40位、第66位から第80位の配列を持つことが重要である。ゆえに、HCV抗体を検出する抗原としては、HCVポリペプチドの第1位から42位、第66位から第80位の配列を含む抗原CEPMを好適な配列を持つ抗原ポリペプチドとして実施例に開示する。なおCEPMはHCVポリペプチドの下記に示す領域を、下記の順に並べた人口配列からなる抗原であり、その構築方法は特願平9-209522に記載されている。また配列は配列番号10に記載されている。

CEPMのHCVエピトープの並び：

(1238-1313) - (1363-1460) - (1712-1751) - (66-80) -
(1686-1704) - (1716-1751) - (66-80) - (1690-1713) -
(1-42)

一方抗原検出においては、被検体中にコア抗原に対する抗体が比較的存在しない領域、すなわちHCVポリペプチドの第100位から130位を認識し結合するモノクローナル抗体を第一次反応に、第一次抗体に結合したコア抗原を検出するための第二次抗体の認識部位としては、抗体検査に用いていない領域、HCVポリペプチドの第40位から50位を認識するモノクローナル抗体を用いて、HCVポリペプチドの第100位から130位に対する抗体によって保持されたコア抗原を検出する。

これらのモノクローナル抗体はいずれも、HCV抗体を検出するために用いているHCVポリペプチドの第1位から42位までを含む抗原には結合しないことから、上記のモノクローナル抗体、上記の抗原を用いることにより、結合による抗原検出系、抗体検出系への反応阻害が生じ得ず、それぞれの測定系を同時に機能させることができた。

実施例

以下実施例によって本発明を詳細に説明する。

実施例 1. H C V 由来ポリペプチドの発現プラスミドの発現および精製

(A) 発現プラスミドの構築

H C V のコア領域に相当する発現プラスミドは以下の方法で構築した。C 1 1 - C 2 1 クローンおよびC 1 0 - E 1 2 クローン（特開平6-38765）をp U C 1 1 9 に組み込んで得られたプラスミドp U C · C 1 1 - C 2 1 およびp U C · C 1 0 - E 1 2 の各DNA 1 μ g を制限酵素反応液 2 0 μ l [5 0 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 0 mM MgCl₂、1 mM DTT、1 0 0 mM NaCl、1 5 単位のEcoRI および1 5 単位のC1aI 酵素] 中、および [1 0 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 0 mM MgCl₂、1 mM DTT、5 0 mM NaCl、1 5 単位のC1aI および1 5 単位のKpnI 酵素] 中で各々37°C 1 時間消化し、その後0.8%アガロースゲル電気泳動を行ない、約380 bpのEcoRI-C1aI 断片および約920 bpのC1aI-KpnI 断片を精製した。

この2つのDNA断片とp U C 1 1 9 をEcoRI およびKpnI で消化したベクターに1 0 \times リガーゼ用緩衝液 [6 6 0 mM Tris-HCl (pH 7.5)、6 6 mM MgCl₂、1 0 0 mMジチオスレトール、1 mM ATP] 5 μ l、T4リガーゼ 1 μ l (3 5 0 単位/ μ l) に水を加えて5 0 μ l とし、1 6 °Cで一晩保温し、連結反応を行なった。このプラスミドを用い大腸菌JM109を形質転換させ、プラスミドp U C · C 2 1 - E 1 2 を得た。

このプラスミドp U C · C 2 1 - E 1 2 DNA 1 ngを2つのプライマー (5' - GAATTTCATGGGCACGAATCCTAAA - 3' (配列番号：

7)、5' - TTAGTCCTCCAGAACCCGGAC - 3' (配列番号: 8)) を用い PCRを行なう。PCRはGeneAmpTM (DNA Amplification Reagent Kit, Perkin Elmer Cetus製) のキットを用いDNA変性95°C 1.5分、アニーリング50°C 2分、DNA合成70°C 3分の条件で行ない、得られたDNA断片を0.8%アガロースゲル電気泳動により分解し、グラスパウダー法 (Gene Clean) で精製した。

一方、pUC19を制限酵素SmaIで消化し、PCR法によつて得られたDNA断片を10×リガーゼ用緩衝液 [660mM Tris-HCl (pH 7.5)、66mM MgCl₂、100mMジチオスレトール、1mM ATP] 5μl、T4リガーゼ1μl (350単位/μl) に水を加えて50μlとし、16°Cで一晩保温し、連結反応を行なった。このプラスミドを用い大腸菌JM109を形質転換させ、プラスミドpUC19・C21-E12・SmaIを得た。

このプラスミドDNA 1μgを制限酵素反応液20μl [150mM NaCl、6mM Tris-HCl (pH 7.5)、6mM MgCl₂、15単位のEcoRIおよび15単位のBamHI酵素] 中で37°C 1時間消化反応を行ない、その後0.8%アガロースゲル電気泳動を行ない、約490bpのEcoRI-BamHI断片を分離し、これをグラスパウダー法で精製した。

次に発現ベクターであるTrp·TrpE (特開平5-84085) のDNA 1μgを制限酵素反応液20μl [150mM NaCl、6mM Tris-HCl (pH 7.5)、6mM MgCl₂、15単位のEcoRIおよび15単位のBamHI酵素] 中で37°Cで1時間消化し、その反応液に水39μlを加え、70°Cで5分間熱処理した後にバクテリアアルカリ性ホスファターゼ (BAP) 1μl (250単位/μl) を加えて37°Cで1時間保温した。

この反応液にフェノールを加えてフェノール抽出を行ない、得られた水層をエタノール沈殿し、沈殿物を乾燥した。得られた E c o R I - B a m H I 処理ベクター D N A 1 μ g と上述のコア 1 4 0 断片を 1 0 \times リガーゼ用緩衝液 [6 6 0 mM Tris - H C l (pH 7. 5) 、 6 6 mM M g C l₂ 、 1 0 0 mM ジチオスレトール、 1 mM A T P] 5 μ l 、 T 4 リガーゼ 1 μ l (3 5 0 単位 / μ l) に水を加えて 5 0 μ l とし、 1 6 °C で一晩保温し、連結反応を行なった。

この反応液の 1 0 μ l を用いて大腸菌 H B 1 0 1 株を形質転換した。形質転換に用いる感受性大腸菌株は塩化カルシウム法 [Mandel, M. と Higa, A. , J. Mol. Biol. , 53, 159-162 (1970)] により作られる。形質転換大腸菌を 2 5 μ g / ml のアンピシリンを含む L B プレート (1 % トリプトン、 0. 5 % N a C l 、 1. 5 % 寒天) 上に塗布し、 3 7 °C に一晩保温した。プレート上に生じた菌のコロニーを 1 白金耳取り、 2 5 μ g / ml のアンピシリンを含む L B 培地に移し、一晩 3 7 °C で培養した。

1. 5 ml の菌培養液を遠心して集菌し、プラスミド D N A のミニプレパレーションをアルカリ法 [Maniatis ら、 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (1982)] により行なった。得られたプラスミド D N A 1 μ g を制限酵素反応液 2 0 μ l [1 5 0 mM N a C l 、 6 mM Tris - H C l (pH 7. 5) 、 6 mM M g C l₂ 、 1 5 単位の E c o R I および 1 5 単位の B a m H I 酵素] 中で 3 7 °C 、 1 時間消化し、アガロースゲル電気泳動を行なって、約 4 9 0 bp の E c o R I - B a m H I 断片が生じる T r p · T r p E コア 1 6 0 発現プラスミドを選別した。

(B) クローンコア 1 6 0 でコードされるポリペプチドの発現および精製

発現プラスミド T r p · T r p E コア 1 6 0 をもつ大腸菌 H B 1 0 1 株を 5 0 μ g / ml のアンピシリンを含む 3 ml の 2 Y T 培地 (1 . 6 % トリプトン、 1 % 酵母エキス、 0 . 5 % N a C l) に接種し、 3 7 °C で 9 時間培養する。この培養液 1 ml を 5 0 μ g / ml のアンピシリンを含む 1 0 0 ml の M 9 - C A 培地 (0 . 6 % N a ₂ H P O ₄ 、 0 . 5 % K H ₂ P O ₄ 、 0 . 5 % N a C l 、 0 . 1 % N H ₄ C l 、 0 . 1 mM C a C l ₂ 、 2 mM M g S O ₄ 、 0 . 5 % カザミノ酸、 0 . 2 % グルコース) に植え継ぎ、 3 7 °C で培養した。 O D 6 0 0 = 0 . 3 の時に終濃度 4 0 mg / l になるようにインドールアクリル酸を加え、さらに 1 6 時間培養した。この培養液を遠心分離して菌体を集めた。

菌体に 2 0 ml の緩衝液 A [5 0 mM T r i s - H C l (pH 8 . 0) 、 1 mM E D T A 、 3 0 mM N a C l] を加えて懸濁し、再び遠心分離を行なって発現菌体 2 . 6 g を得た。得られた菌体を緩衝液 A 1 0 ml 中に懸濁し、超音波破碎により大腸菌膜を破碎した後に遠心分離を行ない、 H C V c D N A でコードされるポリペプチドと T r p E の融合ポリペプチドを含む不溶性画分を得た。その画分に 1 0 ml の 6 M 尿素を含む緩衝液 A を加えて融合ポリペプチドを可溶化抽出した。可溶化した抽出物を S - S e p h a r o s e を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィーにかけて、融合ポリペプチドの精製を行なった。

実施例 2. ハイブリドーマの作製法

前記方法により調製した融合ポリペプチド (T r p C 1 1) を 6 M 尿素溶解後、 0 . 1 5 M N a C l を含む 1 0 mM リン酸緩衝液 (pH 7 . 3) に終濃度が 1 . 0 mg / ml となるように希釈し、等量のタイターマックスと混和し、 T r p C 1 1 懸濁液とした。 T r p C 1 1 濃度が 0 . 0 1 ~ 0 . 0 5 mg / ml となるように調製した該懸濁液

を4～6週令のBALB/c系マウスに腹腔内投与した。さらに約1週間後、免疫化動物にTrpC11濃度が0.005～0.03mg/mlとなるように調製した生理食塩水溶液を尾静脈内に投与した。

最終追加免疫後3日目に、この免疫動物より無菌的に脾臓を摘出し、ハサミで切片としてさらにメッシュを用いて脾臓を個々の細胞にほぐし、RPMI-1640培地で3回洗浄した。8-アザグアニジン存在下で数日間培養し、復帰突然変異体を完全に除いた対数増殖期のマウス骨髓腫細胞株PAIを前記と同様に洗浄後、該細胞 1.8×10^7 個と脾臓細胞 1.0×10^8 個を50ml容の遠心管に入れ混合した。 $200 \times g$ 、5分間遠心分離を行ない、上清を除去し、37℃に保温した50%ポリエチレングリコール(PEG)4000(メルク社製)を含むRPMI-1640培地1mlを加えて細胞融合させた。

融合細胞は、遠心分離($200 \times g$ 、5分間)によってPEGを除いた後、96ウエルプレートを用いて、ヒポキサンチン、アミノブテリンおよびチミジン(以下、HATと省略)を含むRPMI-1640培地中で1～2週間培養してハイブリドーマのみを増殖させた。その後、HATを含まない培地で成育させ、約2週間後目的の抗体を産生するクローンをELISA法により検索し、所望の反応特異性を有する本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得た。

得られたハイブリドーマについて、常法の限界希釈法に従い、目的とする抗体の産生株の検索および单一クローン化を行ない、得られたハイブリドーマをHC11-14, HC11-10, HC11-3、およびHC11-7と命名した。該4種類のハイブリドーマに関しては、微生物工業技術研究所に平成9年7月4日付でFER

M, B P - 6 0 0 6, F E R M B P - 6 0 0 4, F E R M B P
 - 6 0 0 2 及び F E R M B P - 6 0 0 3 として寄託された。

実施例 3. モノクローナル抗体の作製法

実施例 2 に記載の方法により得られたハイブリドーマをプリスター
 ン等で処理したマウス腹腔に移植し、腹水中に產生されてくるモノ
 クローナル抗体を取得した。該モノクローナル抗体の精製は、プロ
 テイン A を結合させたセファロースカラムにより I g G フラクションを分離した。

前記 5 種類のハイブリドーマから產生されたそれぞれのモノクロ
 ーナル抗体、C 1 1 - 1 4, C 1 1 - 1 0, C 1 1 - 7 および C 1
 1 - 3 のアイソタイプは、ウサギ抗マウス I g 各アイソタイプ抗体
 (Zymed 社製) を用いた二重免疫拡散法により、C 1 1 - 1 0 及び
 C 1 1 - 7 が I g G 2 a, C 1 1 - 1 4 及び C 1 1 - 3 が I g G 1
 であることが明らかとなった。得られた 4 種類のモノクローナル抗
 体について、H C V ・ コア領域由来の配列によって合成した 2 0 の
 ペプチドを用いてエピトープ解析を行なった結果、表 1 に示す如く
 コア領域の一部を特異的に認識するモノクローナル抗体であること
 がわかった。

表 1

抗 体	認 識 部 位
C11-14	⁴ ₁ G l y - ⁵ ₀ A r g (配列番号 4)
C11-10	² ₁ A s p - ⁴ ₀ A r g (配列番号 3)
C11-3	¹ ₀ ⁰ P r o - ¹ ₂ ⁰ G l y (配列番号 5)
C11-7	¹ ₁ ¹ A s p - ¹ ₃ ⁰ P h e (配列番号 6)

実施例 4. 抗原を前処理操作なしで効率的に検出させるための方 法

HCVパーティクルを含む検体を界面活性剤を加えた反応液に希釈し、HCVコア抗原の検出される効率を検討した。

なおHCVコア抗原の検出は、HCVコア抗原に対するモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ酵素免疫アッセイ（EIA）で行った。実施例3で得られたモノクローナル抗体のうち、C11-3とC11-7をコア抗原を補足する抗体として用い、C11-10、C11-14を補足されたコア抗原を検出するための抗体として用いた。

EIAは基本的には以下の条件で行った。モノクローナル抗体C11-3、C11-7を酢酸緩衝液にそれぞれ4 μ g/mlとなるよう希釈した溶液をミクロタイタープレートに加え、4°C一夜保温した。磷酸緩衝液で洗浄し1%BSAを含む磷酸緩衝液を加えることによるブロッキング操作を施した。そこに反応液100 μ l、検体100 μ lを加え、攪拌後、室温で1.5時間反応させた。低濃度の界面活性剤を加えた磷酸緩衝液で洗浄することにより未反応物を除いた後、アルカリリフォスファターゼで標識したモノクローナル抗体C11-10、C11-14を加え、室温30分反応させた。反応終了後、未反応物を低濃度の界面活性剤を加えた磷酸緩衝液で洗浄することにより除き、基質液（CDP-Star/emerald11）を加え室温15分反応後、発光量を測定した。

一次反応液中に各種界面活性剤を加えその効果を検討した。HCVに対する抗体の力価が検出感度以下であり、ほとんどHCVに対する抗体を含まないと考えられるHCV抗原陽性血清を用いて、発光量の多寡によってコア抗原の検出感度を調べ健常人血清の発光量を1.0として、それに対する反応比率で表わした。結果を次の表2および表3に示す。

表 2

		健常人血清に対する各血清の反応比率(S/N ratio)				
		No45	No46	No3	No7	No19
効果判定基準		>30.0		>2.0	>2.0	>2.0
添加剤	HLB値	%				
陰イオン性 界面活性剤	ドデシル硫酸ナトリウム	40.0	0.5	5.42		
	ドデシル-N-サルコシン酸ナトリウム	0.5	12.70	2.70		
		2.0	125.43	7.27	3.83	3.70
	パーフルオロアルキルカルボン酸S-113 (ASAHI GLASS製)	0.5	10.55	1.27		
		2.0	6.72	0.91		
陽イオン性 界面活性剤	セチルトリメチルアンモニウムプロミド	0.5	72.97	7.42	3.09	3.52
		2.0	44.55	5.35		
	ドデシルビリジニウムクロライド	0.5	53.43	4.70	2.05	1.52
		2.0	12.44	2.49		
	n-ドデシルトリメチルアンモニウム	0.5	66.84	4.43	2.41	1.63
		2.0	27.98	3.77		
	テトラデシルアンモニウムプロミド	0.05	14.69			
	n-オクチルトリメチルアンモニウムクロライド	0.5	12.57			
		2.0	11.46			
陰イオン性 界面活性剤	CHAPS	0.5	29.57			
		2.0	25.32			
	パーフルオロアルキルベタインS-132 (ASAHI GLASS製)	0.5	11.07	1.61		
		2.0	10.77	1.49		
	3- (ドデシルジメチルアンモニオ)スルホン酸	0.5	57.69			
		2.0	113.19		4.57	3.44
						5.26

表 3

		健常人血清に対する各血清の反応比率(S/N ratio)				
無 添加		No45	No46	No3	No7	No19
効果判定基準		15.67	1.00	1.15	1.34	1.19
添 加 剂	HLB値	%				
非イオン性 界面活性剤	MEGA-10	0.5 2.0	32.11 38.49	3.38 3.53	1.97	1.87 2.84
	Tween 20	16.7 2.0	0.5 16.88 12.36			
	Tween 40	15.6 2.0	0.5 14.96 19.10	1.02 1.32	0.99 1.25	1.41 1.64
	Tween 80	15.0 2.0	0.5 12.45 17.47	1.33	1.23	1.10
	Nonidet P-40	13.1 2.0	0.5 43.14	3.09	2.95	4.58
	オクチルグルコシド	0.5 2.0	12.48 25.07	0.90 1.92	0.60 1.20	0.97 2.63
	Triton X101	13.4 2.0	0.5 26.50 60.84	1.85 2.23	1.62 2.28	2.70 3.81
	Triton X100	13.5 2.0	0.5 27.72 71.08	2.90	2.34	3.86
	Triton X114	12.4 2.0	0.5 31.49 58.62	2.04 1.92	1.65 2.11	2.77 2.51
	Triton X305	17.3 2.0	0.5 10.50 25.91	0.94 1.30	0.97 1.24	1.08 1.87
	Triton X405	17.9 2.0	0.5 12.54 24.92	0.86 1.21	0.78 1.24	1.04 1.25
その他	ベンジルジメチルフェニルアソニウム クロライド	0.5 2.0	5.45 7.01	1.00 1.12		
	トリエチルアミン	0.5	3.89	0.97		
界面活性剤 の混合	2%ドデシル-N-サルコシン酸ナトリウム +2% Triton X100	244.13	6.11	5.50	12.71	

この結果から、T r i t o n X 1 0 0 に代表されるように、H L B 値が 1 2 ～ 1 4 間を示す非イオン性界面活性剤の添加により、H C V 抗原陽性血清では、健常人血清と比較して発光量が増大し、検出感度が上昇することが判明した。また、同様にドデシル-N-サルコシン酸ナトリウムやドデシルトリメチルアンモニウムに代表されるように、直鎖アルキル基と第 2 ～ 第 4 級アミンを同時にその構造にもつ界面活性剤の添加により、H C V 抗原陽性血清における検出感度が上昇することも判明した。炭素数 8 以下のアルキル基をもつ前記界面活性剤はこのような感度上昇効果は認められなかった。また、これらの 2 種類の界面活性剤を混合（表 2 では 2 % ドデシル-N-サルコシン酸ナトリウムと 2 % T r i t o n X 1 0 0 を混合）添加することにより、さらに H C V 抗原陽性血清における検出感度が上昇することも判明した。

実施例 5. H C V 感染後の H C V 抗体出現前（ウインドピリオド期）の検体中のコア抗原検出

市販セロコンヴァージョンパネル P H V 9 0 5 (B. B. I. in c.) を、反応液中に 2 % の T r i t o n X 1 0 0 及び 2 % のドデシル-N-サルコシン酸ナトリウム添加し、実施例 4 に準じて測定した。ここで用いた P H V 9 0 5 パネルは、観察開始後 2 1 日目（血清 No. P H V 9 0 5 - 7）に抗 H C V 抗体検査（オルソ E I A. 3 . 0）で陽転化を示したものであり、その抗体価はカットオフインデックス (S / C O) で表されており、1. 0 以上が陽性と判定される。H C V コア抗原活性（発光量）は、健常人血清の発光量を 1. 0 として、それに対する比率 (S / N) で表した。

表 4 に示したように、まだ抗 H C V 抗体が陽性となる前にコア抗原活性が認められ、この界面活性剤の添加により、ウイルス粒子からコア抗原性が露呈し、固相化されたモノクローナル抗体と反応し

検出できていることが確認された。

表 4

血清No.	観察開始後 日 数	HCVコア抗原 活性(S/N)	抗HCV抗体価 (S/CO)
PHV 905-1	0	5.32	0.000
905-2	4	8.30	0.000
905-3	7	15.63	0.000
905-4	11	4.37	0.300
905-5	14	14.75	0.700
905-6	18	7.57	0.700
905-7	21	4.82	2.500
905-8	25	3.31	5.000
905-9	28	1.61	5.000

実施例 6. 検体中に含まれる HCV 抗体の検出とコア抗原との同時検出

HCV エピトープに対する抗体が含まれ、かつ HCV 抗原がほとんど含まれない検体（ヒト血清）を用いて、界面活性剤を含む一次反応液中で HCV エピトープに対する抗体が失活せず HCV ポリペプチドに結合し、2 次反応液中に抗ヒト抗体を加えることにより検出可能であること、さらにコア抗原が存在する場合にはコア抗原を検出し、HCV エピトープに対する抗体が含まれるときには抗体を、その両者が含まれる時にはその両者を検出可能であることを、以下の方法により確認した。

EIA は基本的には以下の条件で行った。HCV エピトープを含む組換え抗原 C E P M を尿素を含む磷酸緩衝液に希釈して、ミクロタイタープレートに添加し、4 °C 一夜保温する。磷酸緩衝液で洗浄

後、プレートにモノクローナル抗体 C 1 1 - 3, C 1 1 - 7 を酢酸緩衝液に希釀した溶液を加え、4℃一夜保温した。なお組換え抗原 C E P M の作成方法は特願平 9 - 2 0 9 5 2 2 に記載されている。抗体溶液を除いた後、磷酸緩衝液で洗浄し 1% B S A を含む磷酸緩衝液を加えることによるブロッキング操作を施した。

そこに T r i t o n X 1 0 0, ドデシル- N - サルコシン酸ナトリウム及び尿素を含む一次反応緩衝液 1 0 0 μ l 、検体 1 0 0 μ l を順次加え、攪拌後、室温で 1. 5 時間反応させた。低濃度の界面活性剤を加えた磷酸緩衝液で洗浄することにより未反応物を除いた後、ホースラディッシュパーオキシダーゼで標識した H C V コア抗原に対するモノクローナル抗体 C 1 1 - 1 4 と、ヒト I g G に対するマウスモノクローナル抗体を含む 2 次反応緩衝液を加え、室温 3 0 分反応させた。

反応終了後、未反応物を低濃度の界面活性剤を加えた磷酸緩衝液で洗浄することにより除き、基質液（オルトフェニレンジアミン）を加え室温 2 0 分反応後、吸光度を測定した。

H C V コア抗原をほとんど含まないことが確認されている H C V 抗体陽性ヒト血清を、ウマ血清により希釀したものを検体として、H C V エピトープに対する抗体が検出されていることを確認したところ、濃度依存的に反応することが確認され、抗体が一次反応液中で失活することなく検出されていることが確認された。

表 5 : HCV抗原と HCV抗体の同時測定

(比較例) (比較例) (本発明)

標識抗体 :	POD-標識 c11-14	POD-標識 抗ヒト IgG	POD-標識 c11-14と POD-標識 抗ヒト IgG
固 相	c11-3と c11-7	CEPM	c11-3と c11-7と CEPM
サンプル 組換え コア抗原 ng / ml	陽性血清 希釈倍数		
—	—	0.001	0.000
50	—	2.784	0.000
12.5	—	2.822	0.000
3.1	× 2048	1.586	0.210
0.78	× 512	0.423	0.539
0.2	× 128	0.085	1.139
0.048	× 32	0.014	1.746
—	× 8	0.000	2.161

(値は OD492 / OD690)

一方組換えコア抗原をウマ血清に加え、ウマ血清により希釈したものを検体として、測定したところ濃度依存的に組換えコア抗原が検出できていることが確認された。

コア抗原とヒト血清を適当量加えたウマ血清を検体として測定したところ、表 4 に示すごとく、組換えコア抗原のみを含む場合には組換えコア抗原によるシグナルが得られ、ヒト HCV 抗体陽性血清のみを含む場合には HCV 抗体のみのシグナルが得られ、両者を含む場合には両者のシグナルが加算されたシグナルが得られた。故に抗原検出系、抗体検出系の両者が互いに他を干渉しあうことなく機能し、HCV 抗原と HCV ポリペプチドのエピトープに対する抗体が検出できていることが分かった。

実施例 7. ヒト血清中の抗原抗体測定法

健常人検体と患者検体、および血清陽転化パネル検体（BBI inc.）を用いて、実施例 6 に記載した方法に従い抗原と抗体の同時測定を行った。なおパネル血清については、販売元が提供している HCV 抗体検出試薬での判定結果との比較を行った。

健常人検体 18 例を用いて測定した結果を表 6 に示すが、健常人には反応しないことが確認された。健常人の分布から、陽性と陰性の判別値を 0.1 と設定した。

表 7 に示すごとく HCV 陽性検体ではいずれも陽性の値を与えた。

一方表 8 に示すごとく、パネル血清では抗体検査では陽性であることを判別できなかったポイント、1 から 6 の間で陽性判定を与えた。これらのポイントは、AmpliCor HCV test の判定結果は陽性判定が与えられており、いわゆるウィンドピリオドに相当するが、ウィンドピリオドの検体でも陽性判定を与えることが確認された。

表 6

検体番号	吸光度
健常人 1	0.063
2	0.057
3	0.066
4	0.025
5	0.045
6	0.063
7	0.047
10	0.033
11	0.036
13	0.037
14	0.030
15	0.028
16	0.031
17	0.040
18	0.051
19	0.052
20	0.031
21	0.053
mean	0.044

表 7

患者検体	吸光度
3	2.892 陽性
16	2.335 陽性
45	0.394 陽性
84	2.769 陽性

表 8

パネル血清	吸光度	判定	抗体アッセイ	AmpliCor HCV test
PHV907-1	0.557	陽性	陰性	陽性
2	0.397	陽性	陰性	陽性
3	0.357	陽性	陰性	陽性
4	0.224	陽性	陰性	陽性
5	0.192	陽性	陰性	陽性
6	0.247	陽性	陽性	陽性
7	2.414	陽性	陽性	陽性

実施例 8. モノクローナル抗体の作製

実施例 3 に記載の方法により新たなハイブリドーマを作製し、H C 11-15 と命名した。微生物工業技術研究所に平成 11 年 7 月 16 日付で、F E A M B P - 9 7 8 2 として寄託された。このハイブリドーマから產生してきたモノクローナル抗体を精製し、アイソタイプを検定したところ、I g G 1 であることが明らかとなった。このモノクローナル抗体は、コア領域の配列によって合成した 20 のペプチドを用いたエピトープ解析の結果、¹⁵Thr - ³⁰Ile (配列番号 9) を特異的に認識するモノクローナル抗体であることがわかった。

実施例9. モノクローナル抗体の抗体価検定

組み換えコア抗原 (Trp c 11) を、 6 M 尿素を含有する 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.3) に終濃度 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように希釈し、マイクロプレートの各ウエルに $100 \mu\text{l}$ ずつ添加した。4°Cで一晩静置した後、吸引し、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.3) で 2 回洗浄した。0.5% カゼインを含有する 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.3) を $350 \mu\text{l}$ ずつ添加し、室温で 1 時間インキュベートした後、吸引した。反応液で連続的に希釈した各モノクローナル抗体 (C 11-3, C 11-7, C 11-10, C 11-14 又は C 11-15) を各ウエルに添加し、1 時間反応させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体を添加し、30 分間反応させ、洗浄後、オルトフェニレンジアミンと過酸化水素の入った基質液を添加し酵素反応させた。室温で 30 分間反応させた後、2 N 硫酸を添加して酵素反応を停止させ、マイクロプレートリーダーで 492 nm の吸光度を測定した。図 1 にその結果を示した。

C 11-15 が最も抗体価が高く、2 次抗体として使用した場合感度高く検出できることが示された。

実施例10. 固相化モノクローナル抗体の違いによるサンドイッチE L I S A 検定

各モノクローナル抗体 (C 11-3 と C 11-5 と C 11-15; C 11-3 と C 11-7; C 11-3 と C 11-15; C 11-3 単独; C 11-7 単独; 又は C 11-15 単独) を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.3) に終濃度 $6 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように希釈し、マイクロプレートの各ウエルに $100 \mu\text{l}$ ずつ添加した。4°Cで一晩静置した後、吸引し、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.3) で 2 回洗浄した。0.5% カゼインを含有する 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.3) を $350 \mu\text{l}$ ずつ添加し、室温で 2 時間インキュベートした後、吸引した。HCV-RNA 陽性

で抗HCV抗体陰性検体100μlと反応液100μlを各ウエルに添加し、室温で1時間反応させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗コア抗原モノクローナル抗体（C11-14&c11-10の混合物）を添加し、30分間反応させ、洗浄後、オルトフェニレンジアミンと過酸化水素の入った基質液を添加し酵素反応させる。室温で30分間反応させた後、2N硫酸を添加して酵素反応を停止させ、マイクロプレートリーダーで492nmの吸光度を測定した。図2にその結果を示した。

C11-15のみの固相化ではあまり検出感度が低いが、c11-15にc11-3やc11-7を混合して固相化することにより、検出感度が上昇することが示された。

実施例11. エピトープキメラ抗原の発現と精製

大腸菌形質転換体CEPM/HB101株を100μg/mlアンピシリンを含むLB培地で37℃一夜培養した。これを1%濃度で100μg/mlアンピシリンを含むM9-CAに接種し、37℃一夜培養した。培養終了後遠心により菌体を集め、50mlのLysis液〔50mM Tris-HCl（pH8.5），30mM NaCl，5mM EDTA〕に再懸濁し、1mlのリゾチーム液10mg/ml Lysozyme）を加え、37℃において1時間処理した。この懸濁液を超音波処理（150W、90秒で2回）にかけることにより細胞を破壊した。15000rpmで、4℃において30分間遠心し不溶性分画を回収した。不溶性分画を50mlのNP40を1%含むA溶液〔50mM Tris-HCl（pH8.5）〕に再懸濁しホモジナイズ（15000rpmで5ストローク）した。懸濁液を15000rpmで、4℃において30分間遠心し不溶性分画を回収した。不溶性分画を50mlの2M尿素を含むA溶液に再懸濁しホモジナイズ（15000rpmで5ストローク）した。懸濁液を15000rpm

で、 4°C において30分間遠心し不溶性分画を回収した。不溶性分画を50mlの6M尿素を含むA溶液に再懸濁しホモジナイズ(1500rpmで5ストローク)した。懸濁液を15000rpmで、 4°C において30分間遠心し可溶性分画を回収した。

6M尿素を含む溶液で可溶化した抗原溶液から、SセファーロースH Pカラム(ファルマシア社)を用いたイオン交換法とSuperelex 75 pg(ファルマシア社)を用いたゲル濾過法によりエピトープキメラ抗原を精製した。

なお、上記キメラ抗原をコードするDNAの塩基配列を配列番号：10に示し、キメラ抗原のアミノ酸配列を配列番号：11に示す。

特許協力条約第13規則の2の寄託された微生物への言及及び寄託機関

寄託機関 名称：工業技術院生命工学工業技術研究所
あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1-3

微生物(1) 表示：HC11-3

寄託番号：FERM BP-6002

寄託日：1997年7月4日

(2) 表示：HC11-7

寄託番号：FERM BP-6003

寄託日：1997年7月4日

(3) 表示：HC11-10

寄託番号：FERM BP-6004

寄託日：1997年7月4日

(4) 表示：HC11-11

寄託番号：FERM BP-6005

寄託日：1997年7月4日

(5) 表 示 : HC11- 4

寄託番号 : FERM BP- 6006

寄託日 : 1997年 7 月 4 日

(6) 表 示 : HC11- 15

寄託番号 : FERM BP- 6782

寄託日 : 1999年 7 月 16 日

請 求 の 範 囲

1. C型肝炎ウイルス（HCV）の測定方法において、炭素原子数10個以上のアルキル基と第2～第4級アミンとを有する界面活性剤もしくは非イオン界面活性剤、又はこの両者の存在下で、HCVコア抗原をそのプローブとの結合により測定することを特徴とする方法。
2. 前記アルキル基と第2～第4級アミンとを有する界面活性剤が、炭素原子数12～16個のアルキル基と第3級又は第4級アミンとを有する界面活性剤である、請求項1に記載の方法。
3. 前記第3級又は第4級アミン界面活性剤が、ドデシル-N-サルコシン酸、セチルもしくはドデシルトリメチルアンモニウム塩、3-(ドデシルジメチルアンモニオ)-1-プロパンスルホン酸、ドデシルピリミジウム塩、又はデカノイル-N-メチルグルカミド（MEGA-10）である、請求項1又は2に記載の方法。
4. 前記非イオン性界面活性剤が、12～14の親水疎水比（HLB）を有する界面活性剤である、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。
5. 前記非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンイソオクチルフェニルテーテル、又はポリオキシエチレンノニルフェニルエーテルである請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。
6. C型肝炎ウイルス（HCV）の測定方法において、請求項1～5に記載の方法によるHCVコア抗原の測定と共に、抗HCV抗体を、そのプローブとの結合により測定することを特徴とする方法。
7. 前記抗HCV抗体のためのプローブが、HCV関連ポリペプチドである、請求項6に記載の方法。

Fig.1

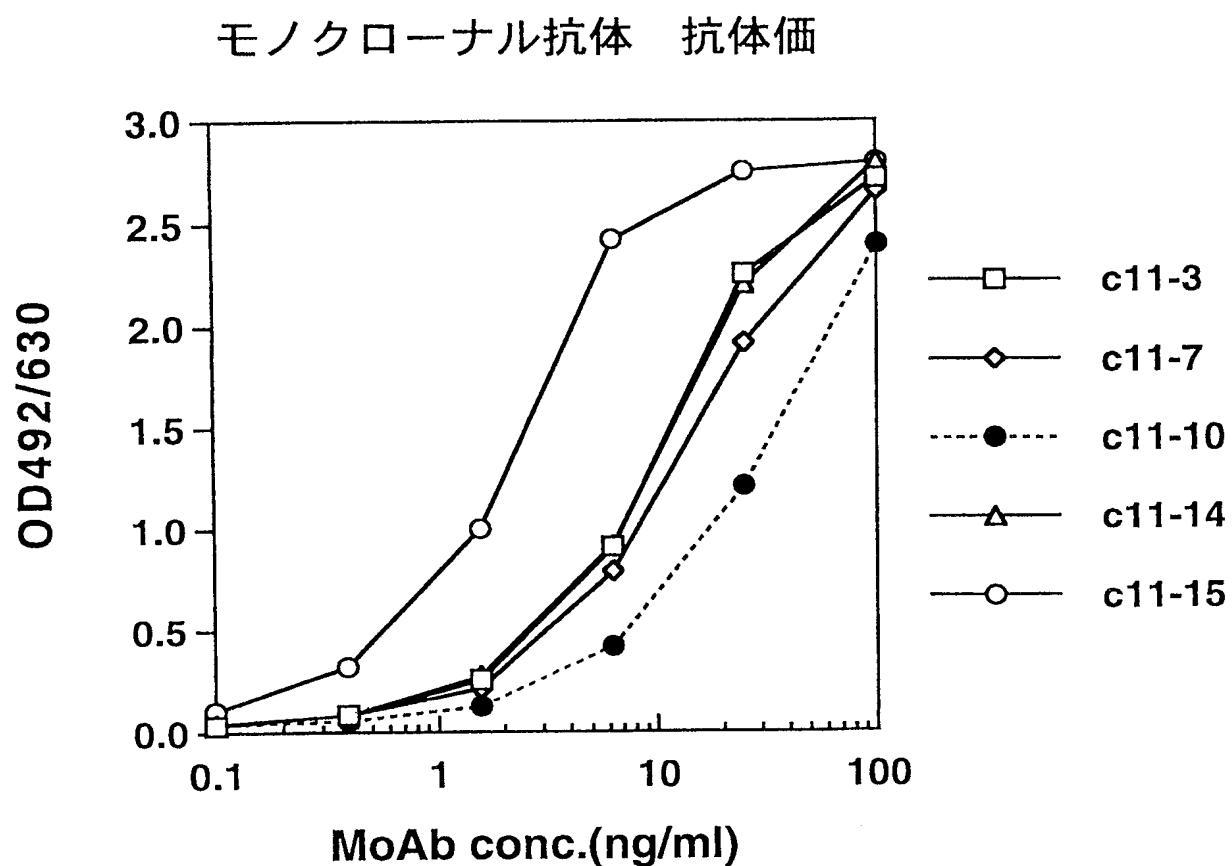
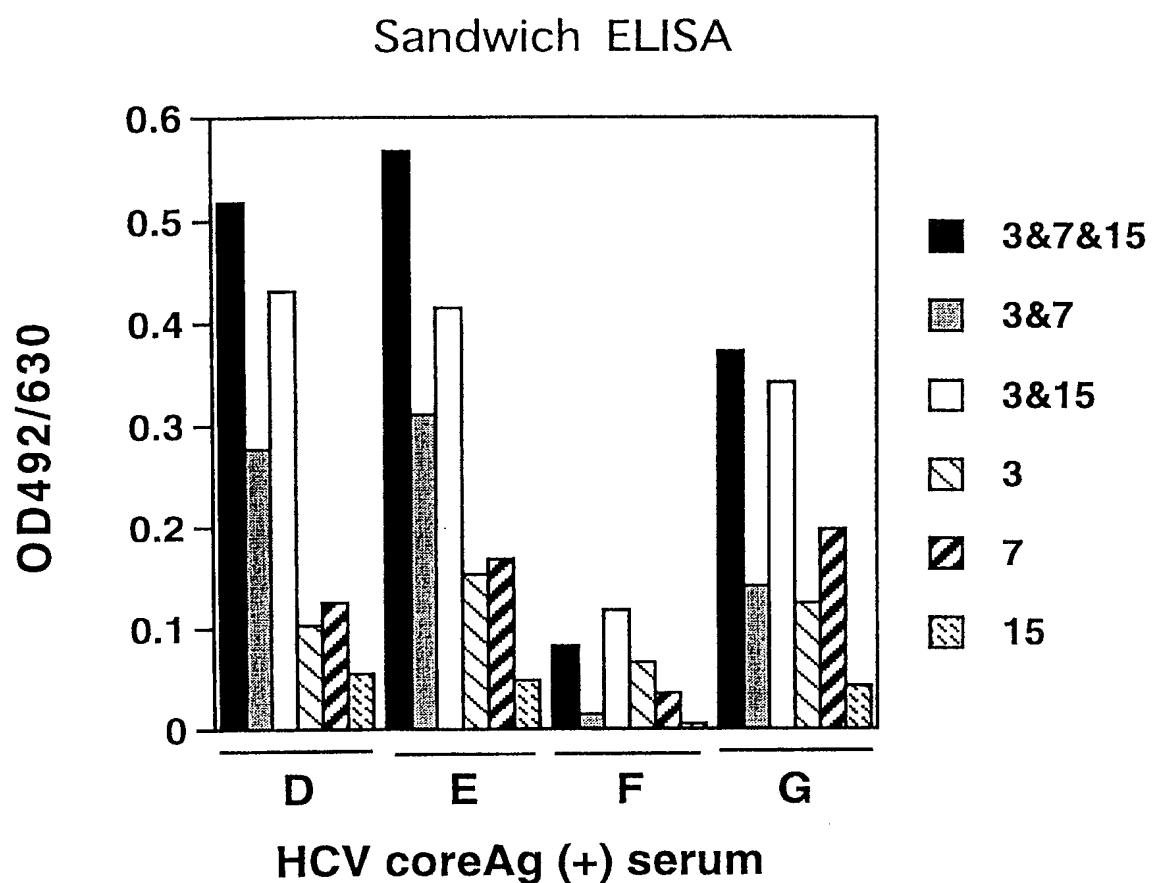


Fig. 2



配列表

SEQUENCE LISTING

< 1 1 0 > Tonen Corporation

< 1 2 0 > Method for Measurement of
hepatitis C virus

< 1 3 0 > G 9 0 2

< 1 5 0 > J P - 1 0 - 2 1 6 0 9 4

< 1 5 1 > 1 9 9 8 - 0 7 - 3 0

< 1 6 0 > 9

< 2 1 0 > 1

< 2 1 1 > 1 7 7

< 2 1 2 > P R T

< 2 1 3 > Hepatitis virus

< 4 0 0 > 1

Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Lys Gly Ser Leu Asp Arg Asp Pro Glu

1 5 10 15

Phe Met Gly Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr

20 25 30

Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gln Ile Val

35 40 45

Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg

50 55 60

Ala Thr Arg Lys Thr Ser Lys Arg Ser Gln Pro Arg Gly Gly Arg Arg

65 70 75 80

Pro Ile Pro Lys Asp Arg Arg Ser Thr Gly Lys Ser Trp Gly Lys Pro

85 90 95

Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Leu Gly Trp Ala Gly
 100 105 110
 Trp Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp
 115 120 125
 Pro Arg His Arg Ser Arg Asn Val Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr
 130 135 140
 Cys Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Phe Arg Val Gly Ala Phe
 145 150 155 160
 Leu Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu
 165 170 175
 Asp

< 2 1 0 > 2
 < 2 1 1 > 1 6 0
 < 2 1 2 > P R T
 < 2 1 3 > H e p a t i t i v v i r u s
 < 4 0 0 > 2
 Met Gly Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
 1 5 10 15
 Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gln Ile Val Gly
 20 25 30
 Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala
 35 40 45
 Thr Arg Lys Thr Ser Lys Arg Ser Gln Pro Arg Gly Gly Arg Arg Pro
 50 55 60
 Ile Pro Lys Asp Arg Arg Ser Thr Gly Lys Ser Trp Gly Lys Pro Gly
 65 70 75 80

Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Leu Gly Trp Ala Gly Trp

85

90

95

Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro

100

105

110

Arg His Arg Ser Arg Asn Val Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys

115

120

125

Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Phe Arg Val Gly Ala Phe Leu

130

135

140

Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp

145

150

155

160

< 2 1 0 > 3

< 2 1 1 > 2 0

< 2 1 2 > P R T

< 2 1 3 > A r t i f i c i a l S e q u e n c e

< 2 2 0 >

< 2 2 3 >

< 4 0 0 > 3

Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gln Ile Val Gly Val Tyr Leu

1

5

10

15

Leu Pro Arg Arg

20

< 2 1 0 > 4

< 2 1 1 > 1 0

< 2 1 2 > P R T

< 2 1 3 > A r t i f i c i a l S e q u e n c e

< 2 2 0 >

< 2 2 3 >

< 4,0 0 > 4
Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg
1 5 10

< 2 1 0 > 5

< 2 1 1 > 2 1

< 2 1 2 > P R T

< 2 1 3 > A r t i f i c i a l S e q u e n c e

< 2 2 0 >

< 2 2 3 >

< 4 0 0 > 5

Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro Arg His Arg
1 5 10 15

Ser Arg Asn Val Gly
20

< 2 1 0 > 6

< 2 1 1 > 2 0

< 2 1 2 > P R T

< 2 1 3 > A r t i f i c i a l S e q u e n c e

< 2 2 0 >

< 2 3 0 >

< 4 0 0 > 6

Asp Pro Arg His Arg Ser Arg Asn Val Gly Lys Val Lle Asp Thr Leu
1 5 10 15

Thr Cys Gly Phe
20

< 2 1 0 > 7

< 2 1 1 > 2 4

< 2,1,2 > DNA
 \
 < 2,1,3 > Artificial Sequence

< 2,2,0 > Probe

< 2,3,0 > Synthetic DNA

< 4,0,0 > 7

gaattcatgg gcacgaatcc taaa

24

< 2,1,0 > 8

< 2,1,1 > 2 1

< 2,1,2 > DNA

< 2,1,3 > Artificial Sequence

< 2,2,0 > Probe

< 2,3,0 > Synthetic DNA

< 4,0,0 > 8

ttagtccctcc agaacccggac

21

< 2,1,0 > 9

< 2,1,1 > 1 6

< 2,1,2 > PRT

< 2,1,3 > Artificial Sequence

< 2,2,0 >

< 2,3,0 >

< 4,0,0 > 9

Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile

1

5

10

15

< 2,1,0 > 1 0

< 2,1,1 > 1 1 9 7

< 2,1,2 > DNA

< 2,1,3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >
< 2 3 0 > N u c l e o t i d e s e q u e n c e c o d i
n g f o r c h i m e r i c a n t i g e n
< 4 0 0 > 1 0

gaa ttc acc aaa gtg ccg gtt gct tat gcg gcc aaa ggt tat aag gtc 48
Glu Phe Thr Lys Val Pro Val Ala Tyr Ala Ala Lys Gly Tyr Lys Val
5 10 15

ctg gtt ctg gac ccg agc gtt gcc agc acc ctg ggt ttc ggc gcg tat 96
Leu Val Leu Asp Pro Ser Val Ala Ser Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr
20 25 30

ctg agc aag gcc cat ggt gtg aac ccg aac atc cgc acg ggc atc cgt 144
Leu Ser Lys Ala His Gly Val Asn Pro Asn Ile Arg Thr Gly Ile Arg
35 40 45

acc gtt acc acc ggt gct ccg gtg acc tat tcc acc tac ggt aaa tac 192
Thr Val Thr Thr Gly Ala Pro Val Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Tyr
50 55 60

ctg gcg gac ggc ggt tgc gcc ggc ggt gcg tac gat gtg atc gga tct 240
Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ala Gly Ala Tyr Asp Val Ile Gly Ser
65 70 75 80

gga gag gag gtg gcc ctg tct aac act gga gag gtc ccc ttc tat ggc 288
Gly Glu Glu Val Ala Leu Ser Asn Thr Gly Glu Val Pro Phe Tyr Gly
85 90 95

cgc gcg atc ccg atc gaa gcg atc aaa ggc ggt cgc cat ctg gtt ttc 336
Arg Ala Ile Pro Ile Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Val Phe
100 105 110

tgc	cat	agc	aag	gag	aaa	tgc	gat	gaa	ctg	gcg	agc	gcg	ctg	tcc	gga	384
Cys His Ser Lys Glu Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ser Ala Leu Ser Gly																
115						120					125					
ttg	ggt	ctg	aac	gct	gtg	gca	ttc	tat	cgc	ggt	ctg	gac	gtg	agc	att	432
Leu Gly Leu Asn Ala Val Ala Phe Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Ile																
130						135					140					
atc	ccg	acc	cag	ggc	gat	gtg	gtt	atc	gtt	agc	acc	gat	gcg	ctg	atg	480
Ile Pro Thr Gln Gly Asp Val Val Ile Val Ser Thr Asp Ala Leu Met																
145						150				155			160			
acc	ggt	ttt	acc	ggc	gat	ttt	gac	tca	gtg	gtc	gac	tgt	aac	aca	tgc	528
Thr Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Val Asp Cys Asn Thr Cys																
165						170				175						
atc	acc	cag	gga	tct	gga	ctg	gta	agc	ttc	gcg	agc	cat	gtg	ccg	tac	576
Ile Thr Gln Gly Ser Gly Leu Val Ser Phe Ala Ser His Val Pro Tyr																
180						185				190						
atc	gag	cag	ggt	atg	caa	ctg	agc	gaa	caa	ttt	aag	cag	aag	agc	ctg	624
Ile Glu Gln Gly Met Gln Leu Ser Glu Gln Phe Lys Gln Lys Ser Leu																
195						200				205						
ggt	ctg	ctg	cag	acc	gcg	acc	aaa	cag	gcg	gag	gcg	gcc	gcc	ccg	gtg	672
Gly Leu Leu Gln Thr Ala Thr Lys Gln Ala Glu Ala Ala Pro Val																
210						215				220						
gtt	ggc	acc	ccg	aaa	agc	cgc	cgt	ccg	gaa	ggt	cgt	gcc	tgg	gcg	caa	720
Val Gly Thr Pro Lys Ser Arg Arg Pro Glu Gly Arg Ala Trp Ala Gln																
225						230				235			240			
ccg	ggt	acc	atc	atc	ctg	agc	ggt	cgt	ccg	gcg	gtt	gta	ccg	gat	cgt	768
Pro Gly Thr Ile Ile Leu Ser Gly Arg Pro Ala Val Val Pro Asp Arg																
245						250				255						

gaa	gtg	ctg	tat	caa	gaa	ttt	ctc	gag	gcc	tct	aga	gcg	gct	ctc	att	816
Glu Val Leu Tyr Gln Glu Phe Leu Glu Ala Ser Arg Ala Ala Leu Ile																
260	265	270														
gaa	gag	ggg	caa	cg	ata	gcc	gag	atg	ctg	aag	tcc	aag	atc	cag	ggc	864
Glu Glu Gly Gln Arg Ile Ala Glu Met Leu Lys Ser Lys Ile Gln Gly																
275	280	285														
tta	ctg	cag	caa	gcc	tcc	aag	cag	gcc	caa	gac	ata	aaa	atc	gac	ggt	912
Leu Leu Gln Gln Ala Ser Lys Gln Ala Gln Asp Ile Lys Ile Asp Gly																
290	295	300														
acc	ctg	att	att	ccg	aaa	gat	cgt	cgc	agc	acc	ggt	aaa	agc	tgg	ggt	960
Thr Leu Ile Ile Pro Lys Asp Arg Arg Ser Thr Gly Lys Ser Trp Gly																
305	310	315	320													
aaa	ccg	ggc	ttc	ctc	atc	gat	agc	ttg	cat	atc	aac	cag	cga	gcc	gtc	1008
Lys Pro Gly Phe Leu Ile Asp Ser Leu His Ile Asn Gln Arg Ala Val																
325	330	335														
gtt	gca	ccg	gac	aag	gag	gtc	ctt	tat	gag	gct	ttt	gat	gag	atg	gag	1056
Val Ala Pro Asp Lys Glu Val Leu Tyr Glu Ala Phe Asp Glu Met Glu																
340	345	350														
ctc	gcc	atg	ggc	acc	aac	ccg	aaa	ccg	gag	cgt	aaa	agc	aag	cgt	aac	1104
Leu Ala Met Gly Thr Asn Pro Lys Pro Glu Arg Lys Ser Arg Asn																
355	360	365														
acc	aac	cgt	aaa	ccg	cag	gat	att	aaa	ttc	ccg	ggt	agt	ggt	cag	gtg	1152
Thr Asn Arg Lys Pro Gln Asp Ile Lys Phe Pro Gly Ser Gly Gln Val																
370	375	380														
gtg	ggt	ggt	gtg	tac	ctg	gtg	ccg	cgt	cgt	ggt	ccg	taaggatcc			1197	
Val Gly Gly Val Tyr Leu Val Pro Arg Arg Gly Pro																
385	390	395														

< 2,1,0 > 1 1
< 2,1,1 > 3 9 6
< 2,1,2 > P R T
< 2,1,3 > A r t i f i c i a l S e q u e n c e
< 2,2,0 >
< 2,3,0 > A m i n o a c i d s e q u e n c e o f c
h i m e r i c a n t i g e n
< 4,0,0 > 1 1

Glu Phe Thr Lys Val Pro Val Ala Tyr Ala Ala Lys Gly Tyr Lys Val
5 10 15
Leu Val Leu Asp Pro Ser Val Ala Ser Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr
20 25 30
Leu Ser Lys Ala His Gly Val Asn Pro Asn Ile Arg Thr Gly Ile Arg
35 40 45
Thr Val Thr Thr Gly Ala Pro Val Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Tyr
50 55 60
Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ala Gly Gly Ala Tyr Asp Val Ile Gly Ser
65 70 75 80
Gly Glu Glu Val Ala Leu Ser Asn Thr Gly Glu Val Pro Phe Tyr Gly
85 90 95
Arg Ala Ile Pro Ile Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Val Phe
100 105 110
Cys His Ser Lys Glu Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ser Ala Leu Ser Gly
115 120 125
Leu Gly Leu Asn Ala Val Ala Phe Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Ile
130 135 140

Ile Pro Thr Gln Gly Asp Val Val Ile Val Ser Thr Asp Ala Leu Met
145 150 155 160
Thr Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Val Asp Cys Asn Thr Cys
165 170 175
Ile Thr Gln Gly Ser Gly Leu Val Ser Phe Ala Ser His Val Pro Tyr
180 185 190
Ile Glu Gln Gly Met Gln Leu Ser Glu Gln Phe Lys Gln Lys Ser Leu
195 200 205
Gly Leu Leu Gln Thr Ala Thr Lys Gln Ala Glu Ala Ala Ala Pro Val
210 215 220
Val Gly Thr Pro Lys Ser Arg Arg Pro Glu Gly Arg Ala Trp Ala Gln
225 230 235 240
Pro Gly Thr Ile Ile Leu Ser Gly Arg Pro Ala Val Val Pro Asp Arg
245 250 255
Glu Val Leu Tyr Gln Glu Phe Leu Glu Ala Ser Arg Ala Ala Leu Ile
260 265 270
Glu Glu Gly Gln Arg Ile Ala Glu Met Leu Lys Ser Lys Ile Gln Gly
275 280 285
Leu Leu Gln Gln Ala Ser Lys Gln Ala Gln Asp Ile Lys Ile Asp Gly
290 295 300
Thr Leu Ile Ile Pro Lys Asp Arg Arg Ser Thr Gly Lys Ser Trp Gly
305 310 315 320
Lys Pro Gly Phe Leu Ile Asp Ser Leu His Ile Asn Gln Arg Ala Val
325 330 335
Val Ala Pro Asp Lys Glu Val Leu Tyr Glu Ala Phe Asp Glu Met Glu
340 345 350

$$1 \quad 1 \quad / \quad 1 \quad 1$$

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04129

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ G01N33/576

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ G01N33/576

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1999
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1999 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-1999

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US, 5616460, A (Abbott Laboratories), 1 April, 1997 (01. 04. 97), Abstract, column 5, lines 1 to 35 ; column 6, lines 40 to 56 ; Claims & WO, 96/41164, A & EP, 852009, A	1-7
A	JP, 8-5633, A (Dainabot Co., Ltd.), 12 January, 1996 (12. 01. 96), Par. No. [0034] & WO, 95/34812, A	1-7
A	JP, 60-24451, A (Akzo N.V.), 7 February, 1985 (07. 02. 85) & EP, 131974, A	1-7

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search
14 October, 1999 (14. 10. 99)

Date of mailing of the international search report
26 October, 1999 (26. 10. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. C16 G01N33/576

B. 調査を行った分野
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. C16 G01N33/576

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
日本国実用新案公報 1922-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-1999年
日本国登録実用新案公報 1994-1999年
日本国実用新案登録公報 1996-1999年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US, 5616460, A (Abbott Laboratories) 1. 4月. 1997 (01. 04. 97) アブストラクト、第5欄第1-35行、第6欄第40-56行、特許請求の範囲 &WO, 96/41164, A&EP, 852009, A	1-7
A	JP, 8-5633, A (ダイナボット株式会社) 12. 1月. 1 996 (12. 01. 96) 【0034】 &WO, 95/34812, A	1-7

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
14. 10. 99

国際調査報告の発送日
26.10.99

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員) 山村 祥子	2 J	9217
電話番号 03-3581-1101 内線 3252		

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 60-24451, A (アクゾ・エヌ・ヴェー) 7. 2月. 1985 (07. 02. 85) & EP, 131974, A	1-7